

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

Substd. 1,4-benzodiazepin-2-ones - as enzyme inducing agents for use in  
treating conditions involving overproduction of steroid hormones

Patent Assignee: (RICT ) RICHTER GEDEON VEGY

Number of Patents: 023

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week	
BE 830582	A	751016	7548	(Basic)
NL 7507556	A	751230	7603	
DE 2527901	A	760115	7604	
SE 7507039	A	760202	7609	
JP 51019783	A	740624	7614	
DK 7502846	A	760301	7614	
FR 2276054	A	760227	7616	
HU T12907	A	770228	7710	
DD 123887	A	770119	7712	
US 4021421	A	770503	7719	
AT 7504819	A	771215	7802	
GB 1509445	A	780504	7818	
JP 53077080	A	780708	7832	
JP 53077079	A	780708	7832	
CA 1047493	A	790130	7907	
JP 79001716	B	790127	7908	
IL 47495	A	790312	7932	
CS 7504443	A	790531	7934	
CH 632254	A	820930	8241	
CH 634835	A	830228	8311	
SU 1080744	A	840315	8444	
JP 85026113	B	850621	8529	
JP 85026114	B	850621	8529	

Priority Data (CC No Date): HU 74RI0540 (740625)

Abstract (Basic): Novel benzodizepines (I):- (where R1 is halogen, CF3, NO2  
or amino; R2 is H or alkyl and R3 is NO, amino or alkylideneamino, or  
acyloamino opt. substd.), are enzyme inducing agents of use in  
disorders involving the overproduction of certain steroid hormones.

51

Int. Cl. 3

A 61 K 45/08

A 61 K 39/00

52

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



DEUTSCHES PATENTAMT

DT. 25 07 901 A 1

11

## Offenlegungsschrift 25 07 901

12

Aktenzeichen:

P 25 07 901.0

13

Anmeldetag:

24. 2. 75

14

Offenlegungstag:

2. 9. 76

15

Unionspriorität:

22 23 24

16

Bezeichnung:

Pharmazeutisches Präparat zur Krebsbehandlung und Verfahren zu dessen Herstellung

17

Anmelder:

Yeda Research and Development Co. Ltd., Rehovot (Israel)

18

Vertreter:

Lotterhos, H.W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 6000 Frankfurt

19

Erfinder:

Sela, Michael, Prof.; Aron, Ruth, Prof.; Hurvitz, Esther, Dr., Rehovot;  
Maron, Ruth, Tel-Aviv; Levy, Ron, Dr., Rehovot (Israel)

cited in  
process of 98 10 4964.7  
Your Ref. Ent-5 (EPO) Div II

Vorlage nicht besser kopierfähig

2

2507901

-14-

#### Patentansprüche

- (1) Pharmazeutisches Präparat zur Behandlung verschiedener Typen von Tumoren, gekennzeichnet durch ein niedermolekulares Antikrebsmittel, das an für die betreffenden Tumorantigene selektive oder spezifische Antikörper kovalent gebunden ist.
- 2) Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das niedermolekulare Antikrebsmittel über eine funktionelle Gruppe, die für seine Aktivität nicht erforderlich ist, direkt an den Antikörper gebunden ist.
- 3) Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikrebsmittel über ein Verbindungsmittel oder Zwischenglied kovalent an den Antikörper gebunden ist.
- 4) Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikrebsmittel Daunomycin, Adriamycin, Methotrexat, Mitomycin, Cytosin, Arabinosid oder 6-Azauridin ist.
- 5) Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper eine Spezifität gegenüber Antigenen von akuter lymphatischer Leukämie, akuter myelocytischer Leukämie, Lymphom, Brustkarzinom, Blasenkarzinom, Hodenkarzinom, osteogenem Sarkom, Weichgewebesarkom und ähnlichen bösartigen Geschwulsten aufweisen.
- 6) Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikrebsmittel Daunomycin oder Adriamycin ist und die kovalente Bindung über den Aminosukkerteil des Moleküls erfolgt ist.
- 7) Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß an ein Molekül Antikörper etwa 2 bis 10 Moleküle Antikrebsmittel gebunden sind.
- 8) Verfahren zur Herstellung eines Präparates nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem als Antikrebsmittel 1 Daunomycin oder Adriamycin gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß das Anti-

609836/0930

2507901

-15-

krebsmittel einer Perjodat-Oxidation unterworfen wird, die hierbei entstandenen Carbonylgruppen mit den freien Amino-  
gruppen des Proteins umgesetzt werden, die hierbei entstandenen Schiff'sche Basen-Bindungen, vorzugsweise mit Natriumbor-  
hydrid, reduziert werden, worauf das Produkt gereinigt und in bekannter Weise zu einer pharmazeutischen Zubereitung verarbeitet wird.

9) Verfahren zur Herstellung eines Präparates nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem als Antikrebsmittel Methotrexat gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsreaktion mittels eines Carbodiimidreagens durchgeführt wird.

10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung von Methotrexat in Gegenwart von 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid durchgeführt wird.

609836/0930

2

4

2507901

**PATENTANWALT DR.-ING. LOTTERHOS**

606 FRANKFURT (MAIN)  
 KINASTASSE 19  
 TELEFON: (0611) 55 50 61  
 TELEGRAMME: LOMOSAPATENT  
 UNDESZENTRALBANK 50071149  
 POSTCHECK-KONTO 1111 1567 607

III/K FRANKFURT (MAIN), 21. Februar 1975

IEDA Research and Development Co. Ltd.  
 Rehovot, Israel

Pharmazeutisches Präparat zur Krebsbehandlung und Verfahren zu  
 dessen Herstellung

Die Erfindung betrifft neue, pharmazeutisch aktive Präparate, bei denen ein Antikrebsmittel mit niedrigem Molekulargewicht chemisch gebunden ist an Antikörper, die gegenüber Tumorentitäten selektiv oder spezifisch sind. Die Erfindung betrifft auch das neue Mittel enthaltende Zubereitungen zur Behandlung von Brustdrüsen, die von verschiedenen Arten von bösartigen Geschwulsten befallen sind.

In den letzten Jahren wurden mit verschiedenen Antikrebsmitteln gewisse Erfolge erzielt. Unter diesen Mitteln sind besonders folgende zu nennen: Daunomycin, Adriamycin, Methotrexat, Mithramycin, Cytosin, Arabinosid, 6-Azauridin und dergleichen. Alle diese niedermolekularen Verbindungen können gemäß der Erfindung zur Zusammensetzung der neuen Heilmittel dienen.

Die genannten Antikrebsmittel haben den Nachteil, dass sie einen verhältnismäßig hohen Grad der Toxizität aufweisen. Es ist daher in manchen Fällen schwer möglich, die für die Behandlung angemessene Dosierung anzuwenden.

609836/0930

Neuerdings wurden verschiedene Versuche unternommen, um spezifische Antikörper gegen Tumoren herzustellen. Es wurde jedoch bisher nicht der gewünschte Antikrebseffekt erreicht. Gewisse, gegenüber Tumoren selektive Antikörper wurden in nicht covalent r Weise mit Antikrebsmitteln kombiniert, um ihnen die Wirkung solcher Mittel gegen Tumorzellen zu verleihen. Man erreicht jedoch nicht die gewünschten Ergebnisse.

Gemäss der Erfindung erreicht man eine spezifische cytotoxisch Wirkung mit Präparaten, bei denen ein Antikrebsmittel covalent an einen für Tumoren selektiven oder spezifischen Antikörper gebunden ist.

Die Antikörper werden nach ihrer spezifischen cytotoxischen Wirkung ausgewählt. Versuche haben gezeigt, dass eine Reihe von Tumor-spezifischen Antikörpern an Antikrebsmittel fest gebunden werden kann. Letztere sind allgemein Verbindungen mit verhältnismässig niedrigem Molekulargewicht, während die Antikörper ein viel höheres Molekulargewicht, meist in der Grössenordnung von etwa 150 000, aufweisen.

Die Wirksamkeit solcher zusammengesetzter Mittel hängt in weitem Masse von der Natur der chemischen Bindung ab. Dies wurde von Fall zu Fall geprüft, und es wurde klargelegt, dass bei beiden Komponenten funktionelle Gruppen gewählt werden, die für die Aktivität der Komponenten nicht notwendig sind. Die chemische Bindung des Antikrebsmittels an den Antikörper kann direkt oder über ein Verbindungsmittel (Zwischenglied) erfolgen. Als Verbindungsmittel können bivalente Verbindungen, z.B. von der Art des Glutaraldehyds, dienen.

Eine direkte Bindung kann durch verschiedene chemische Reaktionen bewirkt werden, z.B. durch die Öffnung einer Bindung innerhalb des kleinen Moleküls (im allgemeinen des Antikrebsmittels) und anschliessend Bindung an den Antikörper. Die Methoden zur chemischen Bindung von gewünschten Verbindungen an Antikörper sind aus der Literatur bekannt. Zur Herstellung der Erfindungs-

gemässen Präparate muss die Methode der chemischen Bindung sorgfältig ausgewählt werden, da sich bei den einzelnen Verfahren grosse Unterschiede ergeben können. Es wurde gefunden, dass die Spezifität der Antikörper gegenüber den Tumorantigenen im Endprodukt aufrecht erhalten werden kann. Die Spezifität der Antikörper führt zu einer beträchtlichen Konzentration der neuen Präparate im Tumor bzw. in seiner unmittelbaren Nachbarschaft, wodurch die Wirksamkeit erhöht wird und die für den cytotoxischen Effekt erforderliche Gesamtdosierung wesentlich herabgesetzt werden kann. So können jetzt Fälle behandelt werden, bei denen es bisher nicht möglich war, eine adäquate Dosis des Antikrebsmittels anzuwenden.

Für die Bindung von Daunomycin und Adriamycin an spezifische Immunglobuline ist die Methode der Wehl die Perjodatoxidation des Antikrebsmittels, gefolgt von der Bindung des oxidierten Antikrebsmittels an das Immunglobulin. Darauf wird die Bindung stabilisiert durch Reduktion des Produkts mit einem angemessenen Reduktionsmittel, wie Natriumborhydrid. Für Methotrexat wird die Bindung in Gegenwart von 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid durchgeführt.

Die Präparate gemäss der Erfindung können gegen eine Vielzahl von Tumoren angewendet werden, jedenfalls gegen alle Tumoren, bei denen bisher die in den Präparaten enthaltenen Antikrebsmittel angewendet wurden. Darüberhinaus können sie auch gegen andere Tumoren angewendet werden, gegen die die genannten Antikrebsmittel nicht verwendbar waren, da wegen der Toxizität nicht die erforderlichen Dosen anwendbar waren. Unter den Arten von Tumoren, die mit den neuen Präparaten behandelt werden können, sind folgendes zu nennen: akute lymphatische Leukämie, akute myelocytische Leukämie, Lymphom, Brustcarcinom, Blasenkarzinom, Hodenkarzinom, osteogenes Sarcom, Weichgewebesarcom und ähnliche bösartige Geschwülste.

Die covalente Bindung von Daunomycin und Adriamycin an spezifischen Antitumorsera ist lierten Immunglobulin unter Anwen-



—  
dung der Perjodatoxidation erfolgt vermutlich durch Öffnung der Bindung zwischen C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> des Aminosuckerteils des Moleküls. Dies führt zur Bildung von Carbonylgruppen, die mit den freien Aminogruppen des Proteins reagieren können. Die entstehende Schiff'sche Basen-Bindung wird mit Natriumborhydrid reduziert.

Zur Herstellung wurden etwa 40 ng/ml des Antikrebsmittels in 1 ml PBS mit 0,1 M Natriumperjodat in leichtem molarem Überschuss gemischt und während etwa 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Verbrauch des Überschusses an Perjodat wurde 1 M Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 0,05 M zugegeben. Die Lösung des oxidierten Materials wurde mit 1 ml Tumor-spezifischem Immunglobulin und 20 bis 25 mg/ml 0,15 M Kaliumcarbonat-puffer (pH 9,5) vermischt und während 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde Natriumborhydrid bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml zugegeben. Die Reaktion vollzog sich während 2 Stunden bei 37°C. Freies und gebundenes Antikrebsmittel wurden durch Gelfiltrationschromatographie unter Verwendung von Bio-gel P-100 oder Sepharose 6 B getrennt. Kleine Mengen an freiem Antikrebsmittel wurden aus den Proteinfractionen durch Adsorptionschromatographie an Poropak Q entfernt. Die proteingebundenen Antikrebsmittel gingen unverzüglich durch die Säule. Pro Mol Antikörper waren etwa 2 bis 5 Mol Antikrebsmittel covalent gebunden.

Solche zusammengesetzten Präparate wurden mit verschiedenen Immunglobulinen, die für verschiedene Tumoren spezifisch waren, hergestellt. Unter diesen waren drei Mäuselymphoidtumoren. Die Präparate wurden auf ihre toxische Wirkung auf verschiedene Tumor-target-Zellen geprüft. Gemessen wurde die Inhibierung der RNA-Synthese oder die Verminderung des Wachstums der Tumorzellen nach der Transplantation. Die Präparate gemäß der Erfindung greifen vorzugsweise die Target-Zellen an, erkennbar durch den Antikörperbestandteil des Präparates.

### Tumore

Für diese Versuche wurden verschiedene Lymphknotentumoren verwendet. Diese umfassen eine carcinogeninduzierte B-Zellen-leukämie bei SJL/J-Mäusen (Nature 241 (1973) 396), ein Moloney-Virus-induziertes Lymphom (YAC) bei A/J-Mäusen (J.Nat.Canc.Inst. 32 (1964) 547) und ein mineralölinduziertes Plasmacytom (PCS) bei BALB/c-Mäusen (J.Nat.Canc.Inst. 25 (1960) 847). Ferner wurde ein Lymphom verwendet, das bei Lewis-Ratten durch intrathymische Injektion von Murinstrahlenleukämievirus induziert war. Dieses Rattenlymphom zeigt virale Zelloberflächenantigene, wie das PCS-Plasmacytom, was bei den anderen hier verwendeten Mäusetumoren nicht der Fall ist. Alle Tumoren wurden erhalten im Durchgang ihrer natürlichen animalischen Stämme.

### Antisera

Ein Antiserum zum Rinderserumalbumin (Anti-BSA) wurde in Kaninchen hergestellt durch schwache subkutane Injektion von 2 mg BSA, das in Freund's Adjuvans emulgiert war.

Kaninchenantisera zu B-Leukämiezellen und zu PCS-Zellen wurden durch 4 bis 5 intravenöse Injektionen von  $10^8$  Tumorzellen in fünftägigen Intervallen hergestellt.

Die Antikörperaktivität wurde mittels der komplementabhängigen Cytotoxizität gemessen. Für diese erhielt man Titer von 1/100 bis 1/200 gegenüber ihren Immunisierungszellen. Die Anti-B-leukämieantisera zeigten ähnliche Cytotoxizität gegenüber YAC-Tumorzellen. Die Anti-PCS-antisera wurden nach Absorption für normale BALB/c-Thymus- und Milzzellen verwendet. In der absorbierten Form waren sie cytotoxisch gegenüber beiden Immunisierung-PCS-zellen und den Rattenlymphomzellen, nicht jedoch gegenüber den YAC-Zellen.

Die Immunglobulinfraktionen dieser Antisera wurden durch Fällung mit Ammoniumsulfat bei 33 %iger Sättigung hergestellt. Sie wurden für die Herstellung der erfindungsgemässen Kombinationspräparate verwendet.

### Aktivität des Antikrebswirkstoffs

Die pharmakologische Aktivität von Daunomycin und Adriamycin wurde verweg durch ihre Inhibition der zellularen RNA-Synthese gemessen. Die Versuche wurden mit Mikrotiterschalen (Cook, V-Bod n-schalen) in Eagle's Minimalessentialmedium, enthaltend Penicillin und Streptomycin, ausgeführt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml im Medium suspendiert und in den Schalenvertiefungen in Teilmengen von 50  $\mu$ l verteilt. Die Wirkstoffe wurden in PBS gelöst (0,15 M NaCl, 0,01 M  $\text{PO}_4$ , pH 7,2) und dann den Zellen in Mengen von 50  $\mu$ l zugegeben. Dann wurde - soweit nicht anders angegeben - 2 Stunden bei 37°C in feuchter Atmosphäre 5 %  $\text{CO}_2$  in der Luft inkubiert.

Zu dieser Zeit wurden 10  $\mu$ l, enthaltend 1 <sup>μCi</sup> 5-[ $^3\text{H}$ ]-Uridin in jede Vertiefung zugegeben und weitere 1 bis 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 25  $\mu$ l 25%ige Trichloressigsäure (TCA) zugegeben und die Schalen über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die TCA-Niederschläge wurden gewaschen, in NaOH gelöst und in Ampullen gebracht, um sie - wie in "Transplantation" <sup>13</sup> (1972) 541-545 beschrieben - auszusäulen. Das Scintillationsgemisch bestand aus in r Scintillationslösung auf Basis von Toluol mit Triton X-100 und 0,1 M HCl im Verhältnis von 6:3:1. HCl war beigegeben, um der Chemilumineszenz entgegenzuwirken. Die Versuche wurden dreifach ausgeführt, wobei die Abweichungen allgemein kleiner als 10 % waren. Die Versuche zeigten, dass die Aktivität des Antikrebsmittels auch nach dessen Bindung an das Antikörpermolekül beibehalten blieb, wie es aus Tabelle 1 zu ershen ist.

10

2507901

-7-

Tabell 1

Cyt toxische Aktivität des Kombinationspräparats, ver-  
glichen mit dem freien Wirkstoff

Inkubations- zeit (min)	% Inhibition von [ $^3\text{H}$ ]-Uridin-incorporation		
	freies Dauno- mycin	gebundenes Daunomycin	
		Daunomycin- anti-BSA	Daunomycin-anti-B- leukämie
30	43	20	25
60	58	35	35
90	61	39	48
120	65	53	57
240	83	76	89

$10^7$  B-Leukämie-Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  in Gegenwart von  $4 \mu\text{g/ml}$  Daunomycin, einerseits frei, andererseits proteingebunden, inkubiert. Die Incorporation in das durch TCA fällbare Zellmaterial wurde gemessen und ausgedrückt als prozentuale Inhibition (100 % der Kontrollkultur ohne Wirkstoff).

Pharmakologische Wirkung des Kombinationspräparates

Die spezifische Cytotoxizität der Wirkstoff-immunoglobulin-kombination wurde geprüft, nachdem dieses Präparat Gelegenheit hatte, sich während einer kurzen Inkubation in vitro an Targetzellen zu binden, worauf zur Entfernung nichtspezifischer Proteine und deren Wirkstoffkonjugat gewaschen wurde. Dann wurden die Zellen auf die verbleibenden Wirkungseffekte geprüft.

Die Tumorzellen wurden gewaschen und in Eagle's Medium mit einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml suspendiert und dann in Mengen von  $50 \mu\text{l}$  in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten (Cook, V-Bodenschalen) verteilt. In verschiedenen Konzentrationen wurden freier Wirkstoff, Immunglobulin und Wirkstoff-immunoglobulin-kombination in Mengen von  $50 \mu\text{l}$  zugegeben. Nach Schütteln (Cook AM 69 Mikroschaker) wurde während 5 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.  $100 \mu\text{l}$  des Mediums wurden dann in jede Vertiefung gegeben, und die Schalen wurden bei  $4^\circ\text{C}$  und  $1800 \text{ Upm}$  10 Minuten zentrifugiert.

609836/0930

(International PR-J-Zentrifuge, ausgerüstet mit Cook-Schalen-träger). Das Überstehende wurde durch ein einfaches Abschütteln der umgedrehten Schale entfernt, und die Vertiefungen wurden wieder mit 200  $\mu$ l frischem Medium gefüllt. Dieser Waschvorgang wurde nochmals wiederholt. Schliesslich wurden die Zellen wieder in Eagle's Medium suspendiert (100  $\mu$ l pro Vertiefung) und während 2 Stunden bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> in der Luft inkubiert. 10  $\mu$ l, enthaltend 10  $\mu$ Ci [ $^3$ H]-Uridin, wurden dann in jede Vertiefung gegeben, und nach einer weiteren einstündigen Inkubation wurden 25  $\mu$ l 25%ige TCA zugesetzt. Die TCA-Niederschläge wurden gewaschen, in NaOH gelöst und - wie bei Rosenberg et al. (Transplantation 13 (1972) 541 - 545) beschrieben - radioaktiv gezählt. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als Prozentinhibition der [ $^3$ H]-Uridinincorporation, verglichen mit dem Kontrollmaterial, das entweder salzige oder freie Antikörper in äquivalenter Konzentration zu der Antikörperkonzentration des entsprechenden Präparats enthielt. Die Abweichungen bei den dreifach durchgeführten Versuchen waren allgemein kleiner als 10 %.

Zusätzlich zu dem [ $^3$ H]-Uridin-incorporationsversuch wurden die Target-Tumor-Zellen auf ihre Wachstumsfähigkeit nach der Transplantation untersucht. Nachdem die Zellen in vitro dem Kombinationspräparat ausgesetzt und gewaschen waren, wurden sie in ihre jeweiligen syngenetischen Stämme transplantiert, und es wurde das Überleben der Empfänger verfolgt.

#### Spezifische Zytotoxizität von Daunomycin-anti-B-leukämie-kombinationspräparaten

Daunomycin wurde an Anti-B-leukämie- und Anti-BSA-Immunglobuline gebunden und auf die Zytotoxizität gegenüber B-Leukämiesellen sowie mehreren anderen Tumoren in vitro geprüft. Diese Kombinationspräparate behielten etwa 50 % der Aktivität des freien Wirkstoffs. Die verschiedenen, hier verwendeten Tumoren hatten gleiche Empfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff-immunoglobulin-kombinationspräparat. Für die Versuche wurde eine Konzentration an Daunomycin-immunoglobulin angewendet, die 40 bis 60 % Inhibition der [ $^3$ H]-Uridin-incorporation in den Testzellen ergab, wenn es in Kontakt mit den Targets kam während der gesamten Inkubations-

zeit blieb. Um die Spezifität der Präparate festzustellen, wurden die Testzellen diesen nur für 5 Minuten ausgesetzt, um das Anhaften des spezifischen Antikörpers zu erlauben. Dann wurde zur Entfernung des nichtspezifischen Immunglobulins gewaschen und die Toxizität des mit den Zellen in Kontakt bleibenden Daunomycins wie oben beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2  
Spezifische Cytotoxizität von an Anti-B-Leukämie gebundenem  
Daunomycin

Inkubiert mit	% Inhibition von ( $^3\text{H}$ -Uridin- incorporation (a)				mittlere Überlebens- zeit (Tage) (b)
	Testzellen				
	B-Leukämie	YAC	PC5	Ratten- lymphom	
Daunomycin- anti-B-Leukämie	38 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>	17 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>	19,4
Daunomycin- anti-B2A	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4	9	12,2
Daunomycin- anti-B2A + Anti-B-Leukämie	18 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	N.D. <sup>x)</sup>	N.D. <sup>x)</sup>	12,2
Freies Daunomycin	17	49	33	41	10,7
PBS					11,3

(a) 0,6 µg Wirkstoff, entweder an Protein gebunden oder frei, wurden mit  $10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µl während 5 min. bei 37°C inkubiert. Dann wurden das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und wieder in frischem Medium suspendiert. Nach 2 Stunden weiterer Inkubation wurde mit  $[-^3\text{H}]\text{-Uridin}$  geschüttelt.

(b) Tieren wurden  $10^7$  Zellen injiziert, die vorher kurz mit den verschiedenen Kombinationspräparaten b handelt waren.

Unterschied zwischen <sup>a</sup> und <sup>b</sup> p < 0,001 (Student's T-Test)

Unterschied " " " <sup>c</sup> p < 0,05

Unterschied " " " <sup>d</sup> p < 0,001

x) nicht durchgeführt 609836/0930

Nach den in Tab 11 2 wiederg gegebenen Ergebnissen zeigt das Daunomycin-anti-B-leukämie-kombinationspräparat eine signifikante bleibende Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]-Uridin-incorporation in den B-Leukämiezellen nach diesem kurzen Ausgesetztsein, und der Wäsche.

Bei den verschiedenen, in diesen Versuchen getesteten Targetzellen wurde gefunden, dass deren Empfindlichkeit gegenüber dem spezifischen Daunomycin-anti-B-leukämiekombinationspräparat der Spezifität des Antikörpers folgt. Dies bedeutet, dass das Präparat gegenüber den wechselseitig reagierenden (cross-reacting) YAC-Zellen toxisch ist, jedoch gegenüber den nicht wechselseitig (non-cross-reacting) reagierenden FCS- oder Rattenlymphomzellen (Zeile 1) nicht toxisch ist, selbst wenn die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber dem freien Wirkstoff grösser als die der B-Leukämie-zellen (Zeile 4) ist. Der hier festgestellte spezifische Effekt ist von der Aktivität des Antikörpers abhängig, denn mit dem Daunomycin-anti-BSA-präparat zeigte sich kein Effekt (Zeile 2). Im Falle der B-Leukämie-Testzellen war die Wirkung des Daunomycin-antikörper-kombinationspräparats grösser als die des freien Wirkstoffs (Zeile 4, 1.Zahlenspalte). Freier Antikörper macht die Zellen nicht empfindlicher gegenüber der Wirkung des freien Wirkstoffs, aber er erhöht leicht die Wirkung des nicht-spezifischen Daunomycin-anti-BSA-präparats gegenüber diesen Zellen (Zeile 3, 1.Zahlenspalte). Die durch den Antikörper verursachte schwere Agglutination der Zellen dürfte sich ergeben durch das Einfangen von Daunomycin-anti-BSA, wodurch die Entfernung durch Waschen schwieriger wird. YAC-Zellen, die durch Anti-B-leukämie-antikörper nicht stark agglutiniert sind, werden durch die Mischung von Anti-B-leukämie- und Daunomycin-anti-BSA nicht angegriffen (Zeile 3, 2.Zahlenspalte).

Zusätzlich zur Wirkung bezüglich der RNA-Synthese wurden die Kombinationspräparate auch auf ihre Wirkung auf das Tumorzellenwachstum geprüft. Die Zellen wurden in vitro kurze Zeit dem Kombinationspräparat, dem freien Antikörper oder dem freien Wirkstoff ausgesetzt. Dann wurden sie gewaschen und transplantiert in syngenetisch ~~mit~~ SJL/J-~~BSA~~-Material (Tab 11e 2, letzter Spalt).

Die mittlere Überlebenszeit der Tiere, die unbehandelte Zellen erhielten, betrug 11 Tage. Bei allen Kontrollgruppen, die mit freiem Wirkstoff, freiem Antikörper oder mit einem Gemisch von Anti-B-leukämie-antikörper und Daunomycin behandelte Zellen erhielten, war die Überlebenszeit ebenso wie bei denen, die unbehandelte Zellen erhielten. Allein die Gruppe, welche die mit dem spezifischen Daunomycin-anti-B-leukämie-kombinationspräparat behandelten Zellen erhalten hatten, zeigte eine längere Überlebenszeit. Ihre Überlebenszeit war gleich der von Tieren, die nur  $10^3$  unbehandelte Zellen erhalten hatten.

#### Spezifische cytotoxische Wirkungen von Daunomycin-anti-PCS-kombinationspräparaten

Für diese Versuche wurde an Anti-PCS-Immunglobuline gebundenes Daunomycin verwendet. Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, dass die spezifischen Kombinationspräparate gegenüber den homologen PCS-Targetzellen und den wechselseitig reagierenden (cross-reacting) Rattenlymphomzellen Toxizität aufweisen, während sie gegenüber den nicht wechselseitig reagierenden (non-cross-reacting) YAC-Zellen viel weniger toxisch sind. In diesen Serien von Versuchen diente das Daunomycin-anti-B-leukämie-kombinationspräparat als spezifische Kontrollsubstanz, die das umgekehrte Muster der toxischen Wirkung zeigt. Wiederum war das homologe System Daunomycin-anti-PCS gegenüber den PCS-Testzellen überlegen bezüglich der Wirkung des freien Wirkstoffs auf die gleichen Zellen.

Bei der Prüfung des Wachstums von behandelten PCS-Zellen in syngenetischen BALB/c-Tieren wurde eine schwache Wirkung sowohl des freien Wirkstoffs als auch des freien Antikörpers gefunden. Hingegen führte das spezifische Daunomycin-anti-PCS-kombinationspräparat zu bedeutend höherer Wirkung, wobei bei mehr als 50 % der Tiere der Tumorbefall ausblieb (letzte Spalte der Tabelle 3). Die Überlebenszeit dieser Gruppe von Tieren war gleich der von Tieren, die nur  $10^2$  unbehandelte Tumorzellen erhalten hatten. Die Langzeitüberlebenden waren resistent gegen einen nachfolgenden Test mit  $10^3$  Tumorzellen.



Tabelle 3

Spezifische Toxizität von Daunomycin, gebunden an Anti-PCS-  
immunoglobuline

Inkubiert mit	% Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]-Uridin-incorporation (a)			mittler Überlebenszeit (Tage)
	Testzellen			
	PCS	Rattenlymphom	YAC	
Daunomycin-anti-RPCS	60 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	3 Mäuse >60 2 Mäuse 27,5
Daunomycin-anti-BSA	7 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	N.D. <sup>x)</sup>	19,8
Daunomycin-anti-B-leukämie	16 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	62 <sup>a</sup>	
freies Daunomycin	32 <sup>c</sup>	53	67	25,6
PBS				21

(a) Es wurden 1,5 µg Wirkstoff verwendet, die anderen Bedingungen waren wie bei Tabelle 2

(b) Tieren wurden  $10^7$  Zellen injiziert, die vorher kurz mit den verschiedenen Kombinationspräparaten behandelt waren

Unterschied zwischen <sup>a</sup> und <sup>b</sup>  $P < 0,001$  (Student's  $t$ -Test)

Unterschied zwischen <sup>a</sup> und <sup>c</sup>  $P < 0,001$

In weiteren Versuchsserien wurden die Zellen wie oben kurze Zeit in vitro behandelt, jedoch ohne Waschung transplantiert. Hierdurch gelangen Wirkstoff und nicht spezifische Wirkstoffkombination in das Tier. Die Ergebnisse waren gleichartig. Bei einer Kontrollgruppe, bei der die Zellen einem Gemisch von freiem Wirkstoff und Anti-PCS-antikörper ausgesetzt waren, zeigte sich keine Wirkung, die über die des freien Wirkstoffs allein oder des freien Antikörpers allein hinausgeht.

Die Versuchsserien ergaben, dass Daunomycin, kovalent gebunden an Antikörper, die gegen einen individuellen Tumor gerichtet sind, eine bevorzugende Cytotoxizität gegenüber diesen spezifischen Tumorzellen aufweist. Wenn der Wirkstoff an Anti-B-leukämie-antikörper gebunden ist, dann ist das Kombinationspräparat

x) nicht durchgeführt 609836/0930

16

-15-

2507901

taxisch gegen homologe B-Leukämie-zellen ebenso wie gegen wechselseitig reagierende YAC-Zellen (Tabelle 2). Hingegen zeigt sich gegenüber nicht wechselseitig reagierenden FCS- oder Rattenlymphomzellen keine bezeichnende Toxizität (Tabellen 2 und 3).

609836/0930